

P19771.P04



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Sususmu SEINO et al.

Serial No. : 09/617,099 Group Art Unit : Not yet known

Filed : July 14, 2000 Examiner : Not yet known

For : PROTEIN RIM2

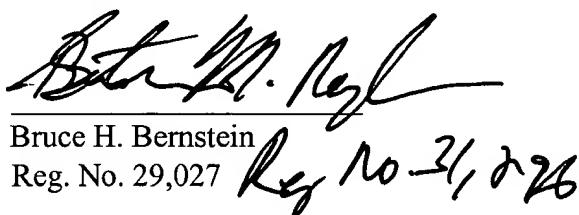
CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 11-288372, filed October 8, 1999. As required by the Statute, a certified copy of the Japanese application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,
Sususmu SEINO et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027 *Reg. No. 31,226*

August 17, 2000
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application: 1999年10月 8日

出願番号

Application Number: 平成11年特許願第288372号

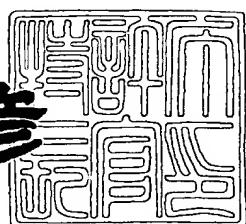
出願人

Applicant(s): 清野 進
日本ケミカルリサーチ株式会社

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3053960

【書類名】 特許願

【整理番号】 P72-99

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区千葉寺町 638-1 青葉の森の街
22-1-4

【フリガナ】 セイ スム

【氏名】 清野 進

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区矢作町 991-128 山和マンシ
ヨン 103

【フリガナ】 シバザキ タダオ

【氏名】 柴崎 忠雄

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区山脇町 4-28-1 エクセル鶴
舞 65

【フリガナ】 オザキ ノブアキ

【氏名】 尾崎 信暁

【特許出願人】

【識別番号】 595145094

【フリガナ】 セイ スム

【氏名又は名称】 清野 進

【特許出願人】

【識別番号】 000228542

【氏名又は名称】 日本ケミカルリサーチ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100104639

【弁理士】

【氏名又は名称】 早坂 巧

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063326

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803334

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質Rim2

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項2】

配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって、GDP/GTP交換反応制御因子IIと相互作用する性質を有するタンパク質。

【請求項3】

請求項1又は2のタンパク質をコードするマウス遺伝子。

【請求項4】

請求項1のタンパク質に対応するcDNAである、配列表の配列番号2に示した塩基配列を有するDNA。

【請求項5】

配列表の配列番号2に示した塩基配列において1個または複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列を有し且つ請求項1又は2のタンパク質をコードするものであるDNA。

【請求項6】

請求項4又は5のDNAのコード領域の塩基配列を有するDNA。

【請求項7】

請求項4のDNAの一部よりなるDNA断片。

【請求項8】

請求項4ないし7のDNAとハイブリザイズするDNAを含んでなるプローブ。

【請求項9】

請求項4ないし7の何れかの塩基配列の部分配列よりなる、プライマー用DNA断片。

【請求項10】

請求項4乃至7の何れかのDNAを保有する組換えベクター。

【請求項11】

請求項1又は請求項2のタンパク質に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体。

【請求項12】

請求項8のプローブ又は請求項11の抗体を含むことを特徴とする、分泌不全又は脳神経系疾患用の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、低分子量Gタンパク質 Rab3 と相互作用し Rab3 依存性のシナプスの小胞融合のレギュレーターとして働くといわれているタンパク質である Rim の新規アイソフォームであって、cAMP 結合能を有する GDP/GTP 交換反応制御因子II (GEFII) 一すなわち cAMP センサー (cAMPS) 一と特異的に相互作用するタンパク質である Rim2 に関する。更に詳しくは、本発明は、個体の恒常性維持に必須である細胞内小胞輸送及び分泌機構を解明し、内分泌疾患や神経疾患等の診断または予防、治療薬の開発に有用な新規のタンパク質である Rim2 及びこれをコードする遺伝子並びにタンパク質 Rim2 に対する抗体に関する。

【0002】

本発明の過程において、タンパク質 Rim2 は主として内分泌組織並びに内分泌系及び神経内分泌系細胞で発現されていることが判明したことから、小胞融合の調節因子であると考えられる。GTP-Rab3/GEFII/Rim複合体は、cAMP 依存性かつタンパク質キナーゼA (PKA) 非依存性に、神経細胞や内分泌細胞のエキソサイトーシスの調節に関与しているものと推定される。

【0003】

【従来の技術】

生物細胞には単位膜で囲まれた小胞体などのオルガネラが存在し、それらの間の物質の移動は細胞内小胞輸送により行われている。脾β細胞や下垂体などの内分泌系細胞では、ペプチドタンパク質は、リボソームで合成されて小胞体に移動し、小胞体から小胞に乗ってゴルジ体を経て分泌顆粒となり細胞膜まで運ばれて

これと融合して、細胞外に分泌される。また、神経細胞においては、神経伝達物質を含んだシナプス小胞の前駆体がゴルジ体で形成され、軸索の微小管に運ばれてシナプスで貯蔵される。シナプス前膜が脱分極すると小胞がシナプス前膜と融合し、神経伝達物質が分泌放出される。このような、小胞と細胞膜との融合による形式で行われる分泌は、エキソサイトーシス（開口分泌）と呼ばれている。

【0004】

逆に、ホルモンなどの細胞増殖因子等種々の細胞外物質が細胞膜受容体に結合すると、その結合体は細胞内に取り込まれてエンドソームを形成するが、この形式による外環境物質の取り込みは、エンドサイトーシスと呼ばれている。

【0005】

エキソサイトーシスやエンドサイトーシスに共通して見られる出芽（budding）等の小胞形成、他の膜系に移動して結合するドッキングや融合等の現象は、Gタンパク質と呼ばれる低分子量のGTP結合タンパク質により調節されている。このタンパク質は30種以上が知られており、別名 Rab ファミリーとして分類されているタンパク質群であって、細胞内小胞輸送系を制御している。

【0006】

現在、細胞内小胞輸送系に関して、Rabタンパク質がグアニンヌクレオチドジフォスフェイト(GDP)に結合して存在している細胞は静止状態にあり、Rabタンパク質にGEF活性を有するタンパク質が作用してGTP結合型Rabタンパク質に変換し、これにGTPが結合してGTP-Rab複合体形成されると、これらが膜上の標的タンパク質に結合し、発芽、ドッキング、融合を引き起こすものと理解されている。

【0007】

神経細胞や内分泌細胞で見られるエキソサイトーシスにおいては、刺激と分泌作用との共役が重要な役割を果たしている [J.E.Rothman, *Nature* 372, 55 (1994) / T.C.Sudhof, *Nature* 375, 645 (1995)]。細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇はエキソサイトーシスの制御に重要であるが、他のシグナルもまた重要な役割を果たすことが知られている。cAMP (サイクリックアデノシン 3',5'-リン酸) / PKA (cAMP-依存性プロテインキナーゼA) シグナル経路は、多くの神経細胞、神経内分泌

細胞、内分泌細胞においてエキソサイトシスを調節することが知られている。特に、cAMP は脳において神経伝達物質の放出を増大させることにより長期増強 (long-term potentiation) を媒介すると考えられている [R.D.Hawkins et al., *Ann.Rev.Neurosci.* 16,625 (1993) / G.Lonart et al., *Neuron* 21,1141 (1998)] 。また例えば、臍β細胞からのインスリン放出や耳下腺細胞からのアミラーゼ放出に関与するエキソサイトシスも、cAMP によって調節されている [P.M.Jones and S.J., Persaud, *Endocrine.Rev.* 19,429 (1998) / E.Renstrom, et al., *J.Physiol.* 502,105 (1997) / K.Yoshimura, *Biochim.Biophys.Acta* 1402,171 (1998)] 。

【0008】

cAMP は、エキソサイトシスの過程に関連する調節タンパク質の PKA 依存性のリン酸化におけるその役割に加えて、神経細胞や非神経細胞のエキソサイトシスの機構に直接に作用することも知られている [G.Lonart, et al., *Neuron* 21,1141 (1998) / E.Renstrom, et al., *J.Physiol.* 502,105 (1997) / K.Yoshimura, *Biochim.Biophys.Acta*, 1402:171 (1998)] 。

【0009】

臍β細胞系の ATP 感受性 K⁺チャネル (K_{ATP}) を構成するスルホニルウレア受容体 [N.Inagaki et al. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 91,2679 (1994)] に直接に共役する細胞内シグナル分子を、二種のタンパク質間相互作用を酵母細胞内で検出する方法である酵母ツーハイブリッドスクリーン (Yeast two-hybrid screen) で探索する過程で、ある cAMP センサーダンパク質 (「CAMPs」と略記) が同定され、CAMPs が、2 個の推定的 cAMP 結合ドメインとプレックストリン (Pleckstrin) ホモジードメイン (PH ドメイン) やグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) のホモジードメインを含むことが見出された。

【0010】

一方、この研究の過程で、二つの研究グループが独立して低分子量 G 結合タンパク質の一つである Rap1 を活性化する cAMP 結合性タンパク質を報告し [J.deRooij et al. *Nature* 396,474 (1998) / H.Kawasaki et al. *Science* 282,2275 (1998)] 、更に、CAMPs タンパク質が cAMP-GEFII のマウス相同体であることが偶

然に明らかにされた [H.Kawasaki et al.Science 282, 2275 (1998)]。

【0011】

この様に、細胞内小胞輸送系についての機能の解明が進んではいるが、いまだ多くの部分が明らかにされていない。神経細胞や分泌系細胞が関係する種々の疾患の診断薬や治療薬を提供するために、これらの機能の解明を更に進めることが求められている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

従来は、cAMP-GEFII に一ヵ所の cAMP 結合ドメインの存在のみが示唆されていたが、本発明者等の研究により、cAMP-GEFII 配列と PKA の調節サブユニットの配列比較から、2つの推定的 cAMP 結合ドメイン(cAMP-A 及び cAMP-B)の存在が示唆された。図1は、cAMP 結合ドメインの配列比較を示しており、cAMP-GEFI I の cAMP 結合ドメインA及びB (それぞれ、cAMP-A 及び cAMP-B)、並びに PKA 調節サブユニット 1 α のcAMP 結合ドメインA及びB (それぞれ、RI α -A 及び RI α -B) が示されている。種々のドメイン中における不变の残基は黒い四角により示されている。

【0013】

図2に示されるように、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と cAMP-A とからなる融合タンパク質は、[3 H] cAMP と約10 μ Mの解離定数(Kd)をもって結合したしかしながら、同じ実験条件では GST-cAMP-B 融合タンパク質の [3 H] cAMP との結合は確認されていない。

図2は、cAMP-A への cAMP の結合を示す。GST-cAMP-A (黒丸) 又は GST-PKA RI α (白丸) を、種々の濃度の [3 H] cAMP (0~50 μ M) とインキュベートした。cAMP-A 及び PKA RI α についてのデータは、最大 cAMP 結合活性に対して標準化してある。Kd 値は、cAMP-A 及び PKA RI α について、それぞれ、10.0±2.3 μ M及び23.7±0.6 nMである。

【0014】

cAMP-B ドメインでは423番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸 (Glu) がリジン (Lys) に置換されているが、このグルタミン酸残基は cAMP の結合に重要

なものである。同等な変異を有するPKA調節サブユニット(E-200-K)において、野性型と比較して急速にcAMPを解離することから、同様に、cAMP-BドメインもまたcAMPを急速に解離している可能性がある。従って、cAMP-BドメインへのcAMPが結合する可能性は、まだ残されている。

【0015】

CAMPSタンパク質すなわちcAMP-GEFIIの標的分子が同定されればその生理学的な役割が示されるであろうことに着目し、本発明者等は、MIN6 cDNAライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーン法(YTH法)によりcAMP-GEFIIと相互作用する分子の同定を試みた。

【0016】

【課題を解決するための手段】

驚くべきことに、本発明者等はcAMP-GEFIIがRim(Rab3に特異的な相互作用性分子:Rab3-interacting molecule:以下、「Rim1」という。)の新規のアイソフォーム(「Rim2」と命名)と相互作用することを見出した。Rim1タンパク質は、低分子量Gタンパク質Rab3のエフェクターであると推定されており、シナプス小胞融合のRab3依存性調節因子として働いているといわれている[Y.Wang et al. Nature 388, 593 (1997)]。

【0017】

本発明により配列決定された新規タンパク質であるRim2は、全長1590個のアミノ酸残基からなり、ラットRim1と61.6%の同一性を示した。図3に示すように、Rim1とRim2の間では、ジンクフィンガードメインとPDZドメイン及びC2ドメインが高度に保存されていた。

【0018】

上記の研究結果に基づき、本発明は、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するタンパク質を提供する。

【0019】

また本発明は、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって、GDP/GTP交換反応制御因子IIと相互作用する性質を有するタン

パク質をも提供する。

【0020】

更に本発明は、次の(1)又は(2)のタンパク質をコードするマウス遺伝子をも提供する。

- (1) 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (2) 該アミノ酸配列において1個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってGDP/GTP交換反応制御因子IIと相互作用する性質を有するタンパク質。

本明細書において、「1個又は複数」のアミノ酸残基は、通常は例えば、数個(例えば3、4個)ないし10個である。

【0021】

更に本発明は、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有する上記タンパク質に対応するcDNAである、配列表の配列番号2に示した塩基配列を有するDNAをも提供する。

【0022】

更に本発明は、配列表の配列番号2に示した塩基配列において1個又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列を有し且つ上記の何れかのタンパク質をコードするものであるDNAをも提供する。ここに、「1個又は複数」の塩基は、通常は例えば数個(例えば3、4個)ないし10個である。そのような1個又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列の作成は、コドンの縮重に関する周知の知識を利用して、当業者は容易に行うことができる。

【0023】

更に本発明は、上記DNA又は配列表の配列番号2に示した塩基配列を有するDNAのコード領域の塩基配列を有するDNAをも提供する。

【0024】

更に本発明は、これらのDNAの一部よりなるDNA断片をも提供する。

【0025】

更に本発明は、上記の各塩基配列の何れかよりなるDNAとハイブリダイズするDNAを含んでなるプローブをも提供する。

【0026】

更に本発明は、上記の各塩基配列の何れかの部分配列よりなる、プライマー用DNA断片をも提供する。

【0027】

更に本発明は、上記の何れかのDNAを保有する組換えベクターをも提供する

【0028】

更に本発明は、前記タンパク質に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体をも提供する。

【0029】

更に本発明は、上記プローブ又は抗体よりなる、ヒト用診断薬をも提供する。該診断薬は、下垂体や視床下部や膵 β 細胞や耳下腺などの分泌系の分泌不全などの疾患や脳神経系疾患などの検査に役立つ。

【0030】

本発明はまた、上記の何れかの疾患の治療薬をも提供する。

【0031】

組換えDNA技術により、種々の変異体の作製が可能である。最初に種々の化学的及び酵素的方法を用いてDNAのクローン断片に変異を生じさせることができ、得られた変異型のDNAにつきDNA配列分析を行い、利点を持つ特定の変異体を選び出す。この方法で種々の変異体を、その表現型に関係なく、システムティックに作製することができる。一般に用いられる変異型クローンの作製方法は、以下の通りである。

【0032】

1. オリゴヌクレオチドを用いて直接にDNA配列に置換、欠損、挿入、付加を起こさせることができる。この方法によれば、DNAの小さな領域に多くの変異を起こさせることができる。

2. より長いオリゴヌクレオチドを用いて所望の遺伝子の合成が可能である。

3. 部位特異的変異作製法 (Region-specific Mutagenesis) を用いて、大きなDNA領域 (1~3 kb) に所望の変異体を作製可能である。

4. DNA のリンカースキャニング変異体作製法 (Linker-scanning Mutagenesis) は相対的に小さなDNA領域 (4-10 bp) にクラスター点変異を作製するのに適した方法である。

5. PCRも、直接的な変異体作製法として利用できる。

[参考文献: Current protocols in molecular biology. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols., Vol.1, Chapter 8: Mutagenesis of cloned DNA, pages 8.0.1-8.5.10]。

【0033】

これら の方法で得られた種々の変異型を含む所望の遺伝子を発現することの可能なプラスミドやベクターの作製方法も、当業者に周知である。すなわち、制限酵素とリガーゼとの組合せを用いて、所望の遺伝子を含んだDNAを発現ベクター-DNAに挿入することにより、所望の遺伝子を含んだ組換えプラスミドを容易に構築することができる。得られた組換えプラスミドを種々の細胞に導入することにより細胞をトランسفェクトし、形質転換細胞を作製することができる。細胞としては、大腸菌などの原核細胞から、酵母や昆虫、植物や動物細胞も利用することができる。

[参考文献: Vectors essential data. Gacesa P. and Ramji D.P. 166 pages. BIOScientific Publishers Limited 1994., John Wiley & Sons in association with BIOS Scientific Publishers Ltd. Expression vectors, pages 9-12.]

【0034】

宿主細胞への組換えプラスミドの導入は、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法により行うことができる。塩化カルシウム法は効率的なトランスポーメイションを与え、特別な装置を必要としない。より高い効率を求めるならば、エレクトロポレーションが用いられるべきである。

[参考文献: Current protocols in molecular biology. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols. Vol.1, unit 1.8: Introduction of plasmid DNA into cells, pages 1.8.1-1.8.10]

【0035】

動物細胞系で通常行われるトランスフェクションには、一過性のものと安定で永久的なものとの2通りが知られている。一過性のトランスフェクションでは、形質転換細胞を1~4日間培養してトランスフェクトした遺伝子を転写、複製し、細胞を回収してDNA分析を行う。代わりに、多くの研究では、トランスフェクト遺伝子を染色体遺伝子に組み込む安定型の形質転換系を作製している。トランスフェクション法としては、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム触媒法などが用いられる。

[参考文献: *Current protocols in molecular biology*. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Son, Inc., *Current Protocols*. Vol.1, Chapter 9: *Introduction of DNA into mammalian cells*, pages 9.0.1-9.17.3.]

【0036】

本発明のRim2遺伝子について、それがコードするタンパク質（ポリペプチド）及びその断片や相同体に対するポリクローナルやモノクローナル抗体の作製も、当該分野において周知の技術を用いて容易に行うことができる。作製された抗体は研究試薬や本Rim2遺伝子の関連する疾患の診断薬として利用可能である。また、得られた抗体は抗体カラムの作製、免疫沈殿法、更にはウエスタンブロッティングによる抗原の同定その他に広く利用できる。

【0037】

本発明のRim2遺伝子がコードするタンパク質に対するmgレベルのモノクローナル抗体の一般的な作製法は、次の通りである。すなわち、抗原タンパク質をマウスに接種して免疫し、十分な抗体タイマーを示すマウスから脾臓を除去する。脾臓細胞を分離して脾臓B細胞を選択し、B細胞起源の骨髄腫細胞に融合し、抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を構築し、ハイブリドーマ細胞から分泌されたモノクローナル抗体を、細胞培養液からアイニティーカラム、イオン交換法、ゲルろ過法等を用いて精製する。また、一般的な方法で本発明物質のポリクローナル抗体をも製造できる。すなわち、免疫動物としては兎、馬、マウス、モルモットなどを用い、当業者に既知の種々のスケジュールで抗原タンパク質を接種して免疫し、採血した血清から免疫グロブリンGなどを単離する。

[参考文献: *Current protocols in molecular biology*. 3 vols. Edited by Au

suel F.M. et al. John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols, Vol.2, chapter 11: Immunology, pages 11.0.1-11.16.13]

【0038】

【発明の実施の形態】

本発明者等は、cAMP-GEFII と Rim2 間の相互作用の特性を評価するために、グルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim2 融合タンパク質に対する FLAG-cAMP-GEFII タンパク質の結合を調べた。

【0039】

すなわち、FLAG 標識 cAMP-GEFII でトランスフェクトした COS-1 細胞、MIN6 細胞又はマウス脳ホモジネートからの溶解物を、GST-Rim1、GST-Rim2、又はGST 単独への結合について評価した。cAMP-GEFII は、抗 FLAG 抗体によって（図4、左）又は cAMP-GERII に対する抗体によるイムノブロッティングによって（図4、中央及び右）、それぞれ検出された。これらの結果は、cAMP-GEFII タンパク質が GST-Rim2 タンパク質と相互作用することを明らかにしている。同様にまた、GST-Rim1 タンパク質もまたマウス脳のホモジネート中において cAMP-GEFII に結合した（図4、右）。これらの結果は、cAMP-GEFII タンパク質が Rim1 及び Rim2 と相互作用することを確認するものである。

【0040】

図5は、ラットの各組織中並びに内分泌細胞及び神経内分泌細胞由来細胞系における cAMP-GEFII、Rim1、及び Rim2 のノーザンプロット分析の結果を示している。サンプルとして、種々の組織及び細胞系からの RNA の $10 \mu g$ （脾島では $5 \mu g$ ）を用いた。ハイブリダイゼーション及び洗浄は、標準の条件下に行った。大脳及び小脳の Rim2 mRNA プロット分析における弱いシグナルは、用いた Rim1 cDNA プローブとの交差ハイブリダイゼーションのためである。図5は、Rim2 mRNA が下垂体や脾ランゲルハンス島、MIN6 細胞、PC12 細胞などの内分泌組織や内分泌及び神経内分泌組織由来細胞系に主として発現されることを明らかにしている。脳内の Rim2 mRNA は、逆転写酵素 PCR によって検出した（データは示さず）。これに対し、同様な分析で Rim1 mRNA は、大脳、小脳や下垂体に発現することが見出された。

【0041】

Rim1 と Rim2 の主な転写体は、Rim1 で 6.4 kb であり、Rim2 で 7.2 kb 及び 5.4 kb であるが、おそらく選択的スプライシング (alternative splicing) によるものと思われる、幾つかの主要でない転写物も見出される。

【0042】

調節性エキソサイトーシスの起こることの知られている組織及び細胞では、一般に、cAMP-GEFII の mRNA は Rim1 mRNA 又は Rim2 mRNA と共に発現されている。図6は、マウス脳及び下垂体における Rim1 及び Rim2 の所在を示す *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を示す。図において： (a) cAMP-GEFII; (b) Rim1; (3) Rim2; (d) 下垂体。スケールバーは、1 mm を示す。略号は：Cb=大脳、Cp= caudoputamen、Cx=皮質、Hi=海馬、Ob=嗅球、Po=橋、Th=視床。

【0043】

Rim2 mRNA は小脳皮質のみに発現が見出され、Rim1 mRNA は大脳皮質、海馬（特に CA3 及び歯状回）、嗅球、小脳皮質に発現されている。また、cAMP-GEFII の mRNA 分布は脳における Rim1 mRNA のそれと大体において重なる。また、Rim2 mRNA と cAMP-GEFII mRNA とは、下垂体前葉において共発現していることが確認された。

【0044】

Rim1 は低分子量Gタンパク質である Rab3 エフェクターであるといわれている [Y. Wang, et al., Nature 388, 593 (1997)]。本発明者等は、酵母ツーハイブリッドアッセイを用いて、Rim2 が、Rim1 と同様に、活性型の Rab3A (Q81L) と相互作用することを見出した（図7）。図7は、酵母ツーハイブリッドアッセイの結果を示し、Rim1、Rim2、又はラブフィリン3と野性型 Rab3A 又は持続的活性な Rab3A (Q81L) との相互作用を種々の組み合わせで、液状β-ガラクトシダーゼ活性のトランス活性化によって測定したものである。

【0045】

加えて、固定化 GST-Rim2 は Rab3A の GTPγS 結合型にのみ結合した（図8）。図8は、*in vitro* での Rim1 又は Rim2 と Rab3A との相互作用を示しており、Rab3A の GTPγS 結合又は GDPγS 結合型を、グルタチオンビーズ上に固定

化した GST-Rim1 (残基1-201) 及び GST-Rim2 (残基1-345) と共に、それぞれインキュベートすることにより得られた結果である。Rab3A は、抗 Rab3A 抗体によるイムノプロッティングにより検出した。これらの結果は、Rim2 タンパク質が、Rim1 タンパク質と同様に、Rab3A の GTP 活性型に結合することを確認するものである。

【0046】

cAMP-GEFII と Rim2 タンパク質の相互作用から、cAMP-GEFII が、調節性エキソサイトーシスに関与することが強く示唆される。その機能的役割を明らかにするために、成長ホルモン (GH) と cAMP-GEFII を共トランスフェクトした PC12 細胞における Ca^{2+} 依存性の分泌に対する cAMP の影響を調べた。

【0047】

PC12 細胞は内因性に Rim2 を発現するが、cAMP-GEFII を発現しないことから、外因性に導入された cAMP-GEFII は内因性の Rim2 と複合体を形成すると推定される。

【0048】

図9は、GH 及び cAMP-GEFII で共トランスフェクトした PC12 細胞からの高 K^+ 誘導 GH 分泌の時間的推移を示すグラフであり、図10は、トランスフェクト PC12 細胞からの GH 分泌に対するフォルスコリンの影響を示すグラフである。フォルスコリン (50 μM) は、低 K^+ (4.7 mM) 又は高 K^+ (60 mM) 溶液によるインキュベーションの10分前に添加した。各記号は次のものを示す： 基底 (低 K^+ 誘導) 分泌：cAMP-GEFII トランスフェクト体 (黒三角)、 β -ガラクトシダーゼトランスフェクト体 (対照) (白三角)： 高 K^+ 誘導分泌： cAMP-GEFII トランスフェクト体 (黒丸)、 β -ガラクトシダーゼトランスフェクト体 (対照) (白丸)。値は、総細胞 GH 量に対する培地中に放出された GH 量のパーセントとして表されている。

【0049】

この共トランスフェクトした PC12 細胞において、図9に示す様に cAMP-GEFII は Ca^{2+} 依存性 (60 mM K^+) の共トランスフェクトした GH の分泌を、対照と比較して変化させなかった、しかし、フォルスコリン (50 μM) 誘導による Ca^{2+} 依

存性の GH 分泌は有意に促進された（図 10）。フォルスコリンは、主としてアデニル酸シクラーゼに作用して細胞内の cAMP 濃度を上昇させる働きを有する。cAMP-GEFII はまた 8-Br-cAMP (1 mM) 誘導性の Ca^{2+} 依存性 GH 分泌を高めた (cAMP-GEFII-トランスフェクト体, 34.9±1.3%; 対照, 25.1±1.8%, n=9, P<0.001)。

【0050】

図 11 は、種々の変異 cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からのフォルスコリン誘導 GH 分泌を示すグラフであり、各変異体 cAMP-GEFII について、15分間のインキュベーションの間における、フォルスコリン (50 μM) 誘導 GH 分泌の (高 K^+ 存在下) の增加分を、野性型 cAMP-GEFII (100%) に対するパーセントで示している。図において： WT=野性型 cAMP-GEFII、T810A=変異型 cAMP-GEFII (T810A)、G114E、G422D、二重変異体 cAMP-GEFII (G114E, G422D)

【0051】

フォルスコリン誘導性の GH 分泌は、潜在的 PKA リン酸化部位がアミノ酸置換により破壊された変異型の cAMP-GEFII (T810A) においては影響を受けなかつた（図 11）。加えて、フォルスコリン誘導性の GH 分泌は、両方の cAMP 結合部位を破壊した変異型の cAMP-GEFII (G114E, G422D) の場合には、野性型に比較して約40%まで減少した。

【0052】

これらの結果は、cAMP が、PKA によるリン酸化の関与を伴うことなしに cAMP-GEFII の結合によって Ca^{2+} 依存性の GH 分泌を促進することを示している。

【0053】

図 12 は、cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からのフォルスコリン誘導 GH 分泌に対する H-89 の影響を示すグラフである。H-89 (10 μM) は、フォルスコリン (50 μM) 処理の10分前に、インキュベーション緩衝液に添加した。cAMP-GEFII トランスフェクト PC12 細胞及び β -ガラクトシダーゼトランスフェクト PC12 細胞の双方において、H-89 (10 μM) による処理は、高 K^+

誘導 GH 分泌を低下させた。データは、3～5回の独立した実験（A～D）より得られたものである。値は、平均±平均偏差（SEM）を示す（P<0.01）。

【0054】

重要なことに、cAMP-GEFII でトランスフェクトし PKA 阻害剤である H-89 で処理した PC12 細胞からのフォルスコリン誘導性 Ca^{2+} 依存性 GH 分泌は、コントロール細胞と比較して有意に高かった。このことは cAMP-GEFII が cAMP 依存性且つ PKA 非依存性のエキソサイトーシスを媒介することを示している。

【0055】

本発明者等は cAMP-GEFII の生理的な関連性を確かめるために、分泌における内因性 cAMP-GEFII の役割を検討した。膵 β 細胞でのインスリン分泌において、cAMPは、PKA 依存性の機構及び PKA 非依存性の機構によってエキソサイトーシスを刺激するといわれている [M.Prentki, F.M.Matschinsky, *Physiol.Rev.* 67, 1 185 (1987) / P.M.Jones, S.J.Persaud, *Endocrine.Rev.* 19, 429 (1998)] 。

【0056】

16.7 mM の高濃度グルコース条件下では、cAMP-GEFII に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された MIN6 細胞における 8-Br-cAMP 誘導性インスリン分泌は有意に減少し(対照オリゴヌクレオチド処理 MIN6 細胞からの分泌の87.5±2.3%, n=27, P<0.005)、cAMP-GEFII が生来の細胞において cAMP 依存性のエキソサイトーシスに関与していることを示唆した。

【0057】

Rab3 タンパク質はエキソサイトーシスの最終段階に関与している。構造的に関連しているタンパク質であるラブフィリン3 (rabphilin3) [H.Shirataki et al., *Mol.Cell.Biol.* 13, 2061 (1993)] と Rim1 はいずれも Rab3A に結合し、このことは複数の Rab3A エフェクターが、形質膜への小胞の結合及び融合の引き金として作用し得ることを示唆している。

【0058】

本発明の過程で、cAMP センサーである cAMP-GEFII は、Rab3 エフェクターである Rim2 と相互作用することにより cAMP 誘導性の Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシスを媒介することが見出された。

【0059】

従来の研究により、分泌過程に関連した PKA によるタンパク質リン酸化の役割に加えて、cAMP が直接にエキソサイトシスに作用することが示唆されている [G.Lonart,et al.,Neuron 21,1141 (1998)/ E.Renstrom,et al.,J.Physiol.502,105 (1997)/ K.Yoshimura,et al.,Biochim.Biophys.Acta 1402,171(1998)]。膵β細胞でも、cAMP による PKA 依存性並びに PKA 非依存性のインスリン放出促進があるといわれている [E.Renstrom,et al.,J.Physiol.502,105 (1997)]。また、耳下腺細胞では、cAMP はおそらく直接にアミラーゼ放出を刺激していると推定されている。加えて、最近の研究は、cAMP が脳のグルタミン酸放出においてもエキソサイトシス機構に部分的であるが直接に作用して促進を示すことを示唆している [G.Lonart,et al.,Neuron 21,1141 (1998)]。

【0060】

しかしながら、ラブフィリン3と Rim1、は脳のほとんどのシナプスに普遍的に発現されているが [C.Li et al.,Neuron 13,885 (1994)]、cAMP に促進されるグルタミン酸放出は、脳の海馬において CA1 領域ではなく CA3 領域のシナプトソームで生じており、これは cAMP-GEFII と Rim1 が主として CA3 において共発現していることと符合する発見である。

【0061】

従って、分泌過程において、PKA 依存性リン酸化に加えて、cAMP は、図13 に概念的に示したように、cAMP-GEFII (cAMPセンサーである) と Rim (Rab3 エフェクターである) の複合体に直接に作用することによって、神経細胞や神経内分泌細胞及び内分泌細胞において、調節性エキソサイトシスを PKA 非依存的に促進するものであろう。

【0062】

これらのこととは、本発明の Rim2 も、神経細胞や分泌細胞のエキソサイトシスの調節において重要な役割を果たしていることを示している。

【0063】

【実施例】

以下、実施例を参照して本発明における操作の具体的手順を示すことにより、

本発明を更に詳細に説明する。

【0064】

<CAMPS (cAMP-GEFII) の cDNA の配列決定>

マウスのインスリン分泌細胞系 MIN6 より、ベクター pVP16 中にプラスミド cDNA ライブライリーを作製した。酵母ツーハイブリッド誘惑 (bait) ベクターを、肺 β 細胞 K_{ATP} チャネルのサブユニットであるラット SUR1 の部分アミノ酸配列(598-1003 : Genbank 受入番号 L40624)をコードする DNA 断片を用いてプラスミド pBTM116 中に構築した。

【0065】

プラスミド MIN6 cDNA ライブライリーの酵母ツーハイブリッドスクリーンを、K.Kotake et al., J.Biol.Chem. 272, 29407 (1997)に記載の方法で行った。cAMP センサーである CAMPS の部分配列(187-730配列)をコードする餌 (pray) クローンを単離した。マウスの CAMPS の全長 cDNA は λ MIN6 cDNA ライブライリーから得られた [N.Inagaki et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 91, 2679 (1994)]。マウスの CAMPS (cAMP-GEFII) のヌクレオチド配列を Genbank に受入番号 AB021132 として預託した。

【0066】

<GST-融合タンパク質の製造及び試験>

cAMP-A(アミノ酸残基、43-153)、cAMP-B(アミノ酸残基、357-469)、及びラット PKA 調節サブユニット (RI α) (全長) を、プラスミド pGEX-4T-1 (Amersham-Pharmacia) を用いて GST 融合タンパク質として発現させ、メーカーのマニュアルに従って精製した。cAMP 結合アッセイを、R.A.Steiberg, et al., J.Biol.Chem. 262, 2664 (1987)に記載の方法を幾分修正して用いることにより行った。

【0067】

要するに、GST 融合タンパク質(1 μ g)を、種々の濃度の [3 H] cAMP、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mg/ml 牛血清アルブミンを含み、40 mM 非標識 cAMP を含む又は含まない結合緩衝液 (200 μ l) 中、氷上で 2 時間インキュベートした。

【0068】

<YTH法による相互作用分子の検討>

酵母ツーハイブリッド誘惑ベクターを、マウスの cAMP-GEFII の全長 cDNA を用いてプラスミド pBTM116 中に構築した。Rim2 の部分配列（アミノ酸残基 53-863）をコードする餌クローンをプラスミド MIN6 cDNA ライブライリーから単離した。Rim2 の全長 cDNA は λ MIN6 cDNA ライブライリーから得た。

【0069】

<Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：I>

「GST-融合タンパク質の製造及び試験」の部に記載の方法に準じて、Rim2 のアミノ酸配列（アミノ酸残基 538-863）を GST 融合タンパク質として発現させ、精製した。cAMP-GEFII の cDNA の全長を、プラスミド pFLAG-CMV-2(Sigma) 中にサブクローンした。得られた構築物をリポフェクタミン (LipofectAMINE : Life Technologies) を用いて COS-1 細胞にトランスフェクトした。この COS-1 変換細胞の溶解物を、グルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim2 と 2 時間、4 °C にてインキュベートした。得られた複合体を蒸留水で洗い、SDS-PAGE で分離し、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) を用いてイムノブロッティングを行った。

【0070】

<Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：II>

MIN6 細胞の溶解物を GST-Rim2 とインキュベートし、cAMP-GEFII と Rim2 の相互作用を、IgG 抗体としてマウス cAMP-GEFII のカルボキシル末端（アミノ酸配列 1001-1011, QMSHRLEPRRP）に対する抗体を用いて、「Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：I」に記載の方法に準じて評価した。

【0071】

<Rim1 と cAMP-GEFII との相互作用の検討>

「GST-融合タンパク質の製造及び試験」の部に記載の方法に準じて、Rim1 の部分配列 (530-806) を GST 融合タンパク質として発現させ、精製した。3 匹のマウスからの脳ホモジエネートをグルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim1 と、4 °C にて終夜インキュベートした。cAMP-GEFII を、「Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：II」の部の記載に準じて検出した。

【0072】

<ラット組織におけるノーザンプロット分析>

プローブとして、マウス cAMP-GEFII (ヌクレオチド配列 606-2237)、ラット Rim1 (1035-1491)、及びマウス Rim2 (586-1490) cDNA を用いて、ラットの各種組織におけるノーザンプロット分析を行った。

【0073】

<マウス脳の *in situ* ハイブリダイゼーション>

マウス脳につき、*in situ* ハイブリダイゼーションを、J.Tanaka, M.Murate, C.Z.Wang, S.Seino, T.Iwanaga, *Arch.Histol.Cytol.* 59, 485 (1996) に記載された方法で行った。

【0074】

マウス cAMP-GEFII と Rim2 に用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブ (45 mer) は、それぞれ核酸配列 2746-2790 及び 1376-1420 の領域に相当する。

【0075】

Rim1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのためには、Rim1 cDNA が部分的にマウス脳からクローニングされた。用いられたプローブは； 5'-ttgcgcctc actcttctggcctcccttgcattctgctctgaaagc-3' である。

【0076】

<Rim2 と Rab3A との相互作用の検討>

「YTH 法による相互作用分子の検討」の部に記載の方法に準じて、野生型のマウス Rab3A と構成的に活性なウシ Rab3A (Q81L) との全長 cDNA を、それぞれ酵母の誘惑ベクター pBTM116 中にクローニングした。

【0077】

ウシのラブフィリン3 (アミノ酸残基 1-283)、ラット Rim1 (アミノ酸配 1-204)、マウス Rim2 (アミノ酸残基 1-345) のジンクフィンガードメインのヌクレオチド配列を餌ベクター pVP16 にクローニングした。液体培養の β -ガラクトシダーゼの活性は、メーカー (Clontech) のマニュアルに従って行った。それらの活性値は、各形質転換細胞からの 3 つの独立したクローンから得られ、OD_{600nm} での吸光度に基づいて細胞数について標準化した。

【0078】

脂質修飾した Rab3A を、 Rab3A を発現している Sf9 細胞の膜画分から精製した。ラットの Rim1 の（アミノ酸残基 1-204）とマウスの Rim2 （アミノ酸残基 1-34）を、GST 融合タンパク質として発現させ、これを精製した。Rab3A の GTP γ S 結合型又は GDP β S の結合型を4℃にて90分、グルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim1 又は GST-Rim2 と共にインキュベートした。Rab3A は、抗 Rab 抗体を用いたイムノブロッティングで検出した。

【0079】

<トランスフェクト PC12 細胞における GH 分泌の検討>

トランスフェクトした PC12 細胞からの GH 分泌を、K. Korake et al., J. Biol. Chem., 272:29407(1997)の記載に準じて評価した。野性型の cAMP-GEFII、変異型の cAMP-GEFII(T810A)、二重変異型の cAMP-GEFII (G114E, G422D) に対するそれぞれの発現プラスミドベクター (pSR α) を調製した。対照としては β -ガラクトシダーゼを用いた。PC 細胞に GH 発現ベクター (pXGH5/Nichols Institute) 及び上記のベクターにより、LipofectAMINEを用いてトランスフェクトした。

【0080】

PC12 細胞を低濃度K $^+$ (4.7 mM)又は高濃度K $^+$ (60 mM)で、またフォルスコリン (50 μ M)の有無若しくは 8-ブロムアデノシン-3',5'-サイクリックモノフォスフェイト (8-Br-cAMP) (1 mM) の存在下又は非存在下にインキュベートした。フォルスコリンまたは 8-Br-cAMP は、低濃度または高濃度カリウム溶液でインキュベーションする10分前に加えられた。いくつかの実験では、PKA インヒビター H-89 (10 μ M) が、フォルスコリン刺激の10分前に加えられた。

【0081】

<cAMP 依存性エキソサイトーシスにおける cAMP-GEFII の役割の検討>

MIN6細胞でのcAMP-GEFIIの合成を妨害するために、マウスの cAMP-GEFII (核酸配列の104-119に相当する領域)に対するアンチセンスのフォスフォロチオエート置換オリゴ DNA (16 mer) と、対照オリゴ DNA (5'-acctacgtgactacgt-3')とを合成した (BIOGNOSTIK)。

【0082】

MIN6 細胞を、インスリン実験の24時間前に、アンチセンスオリゴ DNA 又は対照オリゴ DNA の各 $4 \mu\text{M}$ の濃度で処理した。アンチセンスオリゴ DNA の効率は、一過性トランスフェクションにより cAMP-GEFII を過剰に発現するアンチセンスオリゴ DNA 処理 MIN6 細胞につき、抗 cAMP-GEFII 抗体を用いて、イムノブロッティングにより評価した。アンチセンスオリゴDNA処理された MIN6 細胞における cAMP-GEFII のレベルは著しく低下した。これらのMIN6 細胞での 8-Br-cAMP (1 mM) に対するインスリン分泌応答は、高グルコース濃度 (16.7 mM)において分析した。5回の別個の実験を行い、インスリンの測定は、T.Gonoi et al., J.Biol.Chem.269,16989 (1994)に記載の通りに行った。

【0083】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Seino, Susumu; JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Protein Rim2

<130> P72-99

<160> 4

<210> 1

<211> 1590

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Met Ser Ala Pro Leu Gly Pro Arg Gly Arg Pro Ala Pro Thr Pro Ala

1

5

10

15

Ala Ser Gln Pro Pro Pro Gln Pro Glu Met Pro Asp Leu Ser His Leu

20

25

30

Thr Glu Glu Glu Arg Lys Ile Ile Leu Ala Val Met Asp Arg Gln Lys

35

40

45

Lys Glu Glu Glu Lys Glu Gln Ser Val Leu Lys Ile Lys Glu Glu His

50

55

60

Lys Ala Gln Pro Thr Gln Trp Phe Pro Phe Ser Gly Ile Thr Glu Leu

65

70

75

80

Val Asn Asn Val Leu Gln Pro Gln Gln Lys Gln Pro Asn Glu Lys Glu

85

90

95

Pro Gln Thr Lys Leu His Gln Gln Phe Glu Met Tyr Lys Glu Gln Val

100

105

110

Lys Lys Met Gly Glu Glu Ser Gln Gln Gln Glu Gln Lys Gly Asp

115

120

125

Ala Pro Thr Cys Gly Ile Cys His Lys Thr Lys Phe Ala Asp Gly Cys

130

135

140

Gly His Asn Cys Ser Tyr Cys Gln Thr Lys Phe Cys Ala Arg Cys Gly

145 150 155 160

Gly Arg Val Ser Leu Arg Ser Asn Lys Val Met Trp Val Cys Asn Leu

165

170

175

Cys Arg Lys Gln Gln Glu Ile Leu Thr Lys Ser Gly Ala Trp Phe Tyr

180

185

190

Asn Ser Gly Ser Asn Thr Leu Gln Gln Pro Asp Gln Lys Val Pro Arg

195

200

205

Gly Leu Arg Asn Glu Glu Ala Pro Gln Glu Lys Lys Ala Lys Leu His

210

215

220

Glu Gln Pro Gln Phe Gln Gly Ala Pro Gly Asp Leu Ser Val Pro Ala

225

230

235

240

Val Glu Lys Gly Arg Ala His Gly Leu Thr Arg Gln Asp Thr Ile Lys

245

250

255

Asn Gly Ser Gly Val Lys His Gln Ile Ala Ser Asp Met Pro Ser Asp

260

265

270

Arg Lys Arg Ser Pro Ser Val Ser Arg Asp Gln Asn Arg Arg Tyr Glu

275

280

285

Gln Ser Glu Glu Arg Glu Asp Tyr Ser Gln Tyr Val Pro Ser Asp Gly

290

295

300

Thr Met Pro Arg Ser Pro Ser Asp Tyr Ala Asp Arg Arg Ser Gln Arg

305

310

315

320

特平11-288372

Glu Pro Gln Phe Tyr Glu Glu Pro Gly His Leu Asn Tyr Arg Asp Ser

325 330 335

Asn Arg Arg Gly His Arg His Ser Lys Glu Tyr Ile Val Asp Asp Glu

340 345 350

Asp Val Glu Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Gln Arg Arg Glu Glu Glu

355 360 365

Tyr Gln Ala Arg Tyr Arg Ser Asp Pro Asn Leu Ala Arg Tyr Pro Val

370 375 380

Lys Pro Gln Pro Tyr Glu Glu Gln Met Arg Ile His Ala Glu Val Ser

385 390 395 400

Arg Ala Arg His Glu Arg Arg His Ser Asp Val Ser Leu Ala Asn Ala

405 410 415

Glu Leu Glu Asp Ser Arg Ile Ser Leu Leu Arg Met Asp Arg Pro Ser

420 425 430

Arg Gln Arg Ser Val Ser Glu Arg Arg Ala Ala Met Glu Asn Gln Arg

435 440 445

Ser Tyr Ser Met Glu Arg Thr Arg Glu Ala Gln Gly Gln Ser Ser Tyr

450 455 460

Pro Gln Arg Thr Ser Asn His Ser Pro Pro Thr Pro Arg Arg Ser Pro

465 470 475 480

Ile Pro Leu Asp Arg Pro Asp Met Arg Arg Ala Asp Ser Leu Arg Lys

485 490 495

Gln His His Leu Asp Pro Ser Ser Ala Val Arg Lys Thr Lys Arg Glu

500 505 510

Lys Met Glu Thr Met Leu Arg Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asp Gln Ser

515 520 525

Glu Ser Val Arg Pro Pro Pro Arg Pro His Lys Ser Lys Lys Gly

530 535 540

Gly Lys Met Arg Gln Val Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Leu Ala

545 550 555 560

Ser Thr Pro Glu Tyr Thr Ser Cys Asp Asp Val Glu Leu Glu Ser Glu

565 570 575

Ser Val Ser Glu Lys Gly Asp Ser Gln Lys Gly Lys Arg Lys Thr Ser

580 585 590

Glu Gln Gly Val Leu Ser Asp Ser Asn Thr Arg Ser Glu Arg Gln Lys

595 600 605

Lys Arg Met Tyr Tyr Gly His Ser Leu Glu Glu Asp Leu Glu Trp

610 615 620

Ser Glu Pro Gln Ile Lys Asp Ser Gly Val Asp Thr Cys Ser Ser Thr

625

630

635

640

Thr Leu Asn Glu Glu His Ser His Asp Lys His Pro Val Thr Trp

645

650

655

Gln Pro Ser Lys Asp Gly Asp Arg Leu Ile Gly Arg Ile Leu Leu Asn

660

665

670

Lys Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Pro Arg Asp Ser Gly Ala Met Leu

675

680

685

Gly Leu Lys Val Val Gly Gly Lys Met Thr Glu Ser Gly Arg Leu Cys

690

695

700

Ala Phe Ile Thr Lys Val Lys Lys Gly Ser Leu Ala Asp Thr Val Gly

705

710

715

720

His Leu Arg Pro Gly Asp Glu Val Leu Glu Trp Asn Gly Arg Leu Leu

725

730

735

Gln Gly Ala Thr Phe Glu Glu Val Tyr Asn Ile Ile Leu Glu Ser Lys

740

745

750

Pro Glu Pro Gln Val Glu Leu Val Val Ser Arg Pro Ile Gly Asp Ile

755

760

765

Pro Arg Ile Pro Asp Ser Thr His Ala Gln Leu Glu Ser Ser Ser Ser

770

775

780

Ser Phe Glu Ser Gln Lys Met Asp Arg Pro Ser Ile Ser Val Thr Ser
 785 790 795 800

Pro Met Ser Pro Gly Met Leu Arg Asp Val Pro Gln Phe Leu Ser Gly
 805 810 815

Gln Leu Ser Ile Lys Leu Trp Phe Asp Lys Val Gly His Gln Leu Ile
 820 825 830

Val Thr Ile Leu Gly Ala Lys Asp Leu Pro Ser Arg Glu Asp Gly Arg
 835 840 845

Pro Arg Asn Pro Tyr Val Lys Ile Tyr Phe Leu Pro Asp Arg Ser Asp
 850 855 860

Lys Asn Lys Arg Arg Thr Lys Thr Val Lys Lys Thr Leu Glu Pro Lys
 865 870 875 880

Trp Asn Gln Thr Phe Ile Tyr Ser Pro Val His Arg Arg Glu Phe Arg
 885 890 895

Glu Arg Met Leu Glu Ile Thr Leu Trp Asp Gln Ala Arg Val Arg Glu
 900 905 910

Glu Glu Ser Glu Phe Leu Gly Glu Ile Leu Ile Glu Leu Glu Thr Ala
 915 920 925

Leu Leu Asp Asp Glu Pro His Trp Tyr Lys Leu Gln Thr His Asp Val
 930 935 940

Ser Ser Leu Pro Leu Pro Arg Pro Ser Pro Tyr Leu Pro Arg Arg Gln
 945 950 955 960

Leu His Gly Glu Ser Pro Thr Arg Arg Leu Gln Arg Ser Lys Arg Ile
 965 970 975

Ser Asp Ser Glu Val Ser Asp Tyr Asp Cys Glu Asp Gly Val Gly Val
 980 985 990

Val Ser Asp Tyr Arg His Asn Gly Arg Asp Leu Gln Ser Ser Thr Leu
 995 1000 1005

Ser Val Pro Glu Gln Val Met Ser Ser Asn His Cys Ser Pro Ser Gly
 1010 1015 1020

Ser Pro His Arg Val Asp Val Ile Gly Arg Thr Arg Ser Trp Ser Pro
 1025 1030 1035 1040

Ser Ala Pro Pro Pro Gln Arg Asn Val Glu Gln Gly His Arg Gly Thr
 1045 1050 1055

Arg Ala Thr Gly His Tyr Asn Thr Ile Ser Arg Met Asp Arg His Arg
 1060 1065 1070

Val Met Asp Asp His Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Asp Cys Glu Ala
 1075 1080 1085

Ala Asp Arg Gln Pro Tyr His Arg Ser Arg Ser Thr Glu Gln Arg Pro

1090

1095

1100

Leu Leu Glu Arg Thr Thr Thr Arg Ser Ser Ser Glu Arg Pro Asp

1105

1110

1115

1120

Thr Asn Leu Met Arg Ser Met Pro Ser Leu Met Thr Gly Arg Ser Ala

1125

1130

1135

Pro Pro Ser Pro Ala Leu Ser Arg Ser His Pro Arg Thr Gly Ser Val

1140

1145

1150

Gln Thr Ser Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Gly Arg Arg Gly Arg Gln

1155

1160

1165

Leu Pro Gln Leu Pro Pro Lys Gly Thr Leu Glu Arg Ser Ala Met Asp

1170

1175

1180

Ile Glu Glu Arg Asn Arg Gln Met Lys Leu Asn Lys Tyr Lys Gln Val

1185

1190

1195

1200

Ala Gly Ser Asp Pro Arg Leu Glu Gln Asp Tyr His Ser Lys Tyr Arg

1205

1210

1215

Ser Gly Trp Asp Pro His Arg Gly Ala Asp Thr Val Ser Thr Lys Ser

1220

1225

1230

Ser Asp Ser Asp Val Ser Asp Val Ser Ala Val Ser Arg Thr Ser Ser

1235

1240

1245

Ala Ser Arg Phe Ser Ser Thr Ser Tyr Met Ser Val Gln Ser Glu Arg

1250 1255 1260

Pro Arg Gly Asn Arg Lys Ile Ser Val Phe Thr Ser Lys Met Gln Asn

1265 1270 1275 1280

Arg Gln Met Gly Val Ser Gly Lys Asn Leu Thr Lys Ser Thr Ser Ile

1285 1290 1295

Ser Gly Asp Met Cys Ser Leu Glu Lys Asn Asp Gly Ser Gln Ser Asp

1300 1305 1310

Thr Ala Val Gly Ala Leu Gly Thr Ser Gly Lys Lys Arg Arg Ser Ser

1315 1320 1325

Ile Gly Ala Lys Met Val Ala Ile Val Gly Leu Ser Arg Lys Ser Arg

1330 1335 1340

Ser Ala Ser Gln Leu Ser Gln Thr Glu Gly Gly Lys Lys Leu Arg

1345 1350 1355 1360

Ser Thr Val Gln Arg Ser Thr Glu Thr Gly Leu Ala Val Glu Met Arg

1365 1370 1375

Asn Trp Met Thr Arg Gln Ala Ser Arg Glu Ser Thr Asp Gly Ser Met

1380 1385 1390

Asn Ser Tyr Ser Ser Glu Gly Asn Leu Ile Phe Pro Gly Val Arg Leu

1395 1400 1405

Ala Ser Asp Ser Gln Phe Ser Asp Phe Leu Asp Gly Leu Gly Pro Ala

1410

1415

1420

Gln Leu Val Gly Arg Gln Thr Leu Ala Thr Pro Ala Met Gly Asp Ile

1425

1430

1435

1440

Gln Val Gly Met Met Asp Lys Lys Gly Gln Leu Glu Val Glu Ile Ile

1445

1450

1455

Arg Ala Arg Gly Leu Val Val Lys Pro Gly Ser Lys Thr Leu Pro Ala

1460

1465

1470

Pro Tyr Val Lys Val Tyr Leu Leu Asp Asn Gly Val Cys Ile Ala Lys

1475

1780

1485

Lys Lys Thr Lys Val Ala Arg Lys Thr Leu Glu Pro Leu Tyr Gln Gln

1490

1495

1500

Leu Leu Ser Phe Glu Glu Ser Pro Gln Gly Arg Val Leu Gln Ile Ile

1505

1510

1515

1520

Val Trp Gly Asp Tyr Gly Arg Met Asp His Lys Ser Phe Met Gly Val

1525

1530

1535

Ala Gln Ile Leu Leu Asp Glu Leu Glu Leu Ser Asn Met Val Ile Gly

1540

1545

1550

Trp Phe Lys Leu Phe Pro Pro Ser Ser Leu Val Asp Pro Thr Ser Ala

1555

1560

1565

Pro Leu Thr Arg Arg Ala Ser Gln Ser Ser Leu Glu Ser Ser Thr Gly

1570

1575

1580

Pro Ser Tyr Ser Arg Ser

1585

1590

<210> 2

<211> 4980

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 2

gctccctag ggtgggtcgg ctccgcggaa c atg tcg gct ccg ctc ggg ccc 52
 Met Ser Ala Pro Leu Gly Pro

1

5

cgg ggc cgc ccg gct ccc acc ccg gcg gcc tct caa cct cct ccg cag 100
 Arg Gly Arg Pro Ala Pro Thr Pro Ala Ala Ser Gln Pro Pro Pro Gln

10

15

20

ccc gag atg ccg gac ctc agc cac ctc acg gaa gag gag agg aaa atc 148
 Pro Glu Met Pro Asp Leu Ser His Leu Thr Glu Glu Glu Arg Lys Ile

25

30

35

atc ctg gct gtc atg gat cgt cag aag aaa gaa gag gag aag gag cag 196
 Ile Leu Ala Val Met Asp Arg Gln Lys Lys Glu Glu Glu Lys Glu Gln

40

45

50

55

tcc	gtg	ctc	aag	atc	aaa	gaa	gaa	cac	aaa	gca	caa	ccg	aca	cag	tgg	244	
Ser Val Leu Lys Ile Lys Glu Glu His Lys Ala Gln Pro Thr Gln Trp																	
				60					65					70			
ttt	ccc	ttt	agt	ggg	atc	act	gaa	ctg	gta	aat	aac	gtt	ctg	cag	ccc	292	
Phe Pro Phe Ser Gly Ile Thr Glu Leu Val Asn Asn Val Leu Gln Pro																	
				75					80					85			
cag	caa	aaa	caa	ccc	aat	gag	aag	gag	ccc	cag	aca	aag	ctg	cac	caa	340	
Gln Gln Lys Gln Pro Asn Glu Lys Glu Pro Gln Thr Lys Leu His Gln																	
				90					95					100			
caa	ttt	gaa	atg	tat	aag	gag	caa	gtc	aag	aag	atg	gga	gag	gaa	tcg	388	
Gln Phe Glu Met Tyr Lys Glu Gln Val Lys Lys Met Gly Glu Glu Ser																	
				105					110					115			
cag	cag	cag	caa	gag	cag	aag	ggt	gat	gcc	ccg	acc	tgt	ggc	atc	tgc	436	
Gln Gln Gln Glu Gln Lys Gly Asp Ala Pro Thr Cys Gly Ile Cys																	
				120					125					130			
				135													
cac	aag	aca	aaa	ttt	gca	gat	gga	tgc	ggc	cat	aat	tgt	tcc	tat	tgc	484	
His Lys Thr Lys Phe Ala Asp Gly Cys Gly His Asn Cys Ser Tyr Cys																	
				140					145					150			
caa	acc	aag	ttc	tgt	gct	cga	tgt	gga	ggt	cga	gtg	tct	tta	cgc	tca	532	
Gln Thr Lys Phe Cys Ala Arg Cys Gly Gly Arg Val Ser Leu Arg Ser																	
				155					160					165			

aac aag gtt atg tgg gtg tgt aat ttg tgc cga aaa caa caa gaa atc			580
Asn Lys Val Met Trp Val Cys Asn Leu Cys Arg Lys Gln Gln Glu Ile			
170	175	180	
ctc act aaa tca gga gca tgg ttt tat aat agt ggg tct aac aca ctg			628
Leu Thr Lys Ser Gly Ala Trp Phe Tyr Asn Ser Gly Ser Asn Thr Leu			
185	190	195	
cag caa cct gat caa aag gtt cct cga ggg ctt cga aat gag gaa gcc			676
Gln Gln Pro Asp Gln Lys Val Pro Arg Gly Leu Arg Asn Glu Glu Ala			
200	205	210	215
cct cag gag aag aaa gca aaa cta cac gag cag ccc cag ttc caa gga			724
Pro Gln Glu Lys Lys Ala Lys Leu His Glu Gln Pro Gln Phe Gln Gly			
220	225	230	
gcc cca ggt gac tta tca gta cct gca gtt gag aaa ggc cga gct cat			772
Ala Pro Gly Asp Leu Ser Val Pro Ala Val Glu Lys Gly Arg Ala His			
235	240	245	
ggg ctc aca aga cag gat act att aaa aat gga tca gga gtg aag cac			820
Gly Leu Thr Arg Gln Asp Thr Ile Lys Asn Gly Ser Gly Val Lys His			
250	255	260	
cag att gcc agt gac atg cct tca gac aga aaa cga agt cca tca gtg			868
Gln Ile Ala Ser Asp Met Pro Ser Asp Arg Lys Arg Ser Pro Ser Val			
265	270	275	
tcc agg gat caa aat cga aga tac gag caa agt gaa gaa aga gag gac			916

Ser Arg Asp Gln Asn Arg Arg Tyr Glu Gln Ser Glu Glu Arg Glu Asp

280 285 290 295

tac tca cag tat gtt cct tca gat ggt aca atg cca aga tct cct tcg 964

Tyr Ser Gln Tyr Val Pro Ser Asp Gly Thr Met Pro Arg Ser Pro Ser

300 305 310

gat tat gct gat aga cga tct cag cgt gag cct caa ttt tat gaa gaa 1012

Asp Tyr Ala Asp Arg Arg Ser Gln Arg Glu Pro Gln Phe Tyr Glu Glu

315 320 325

cct ggt cat tta aat tac agg gat tct aac agg aga ggc cat aga cat 1060

Pro Gly His Leu Asn Tyr Arg Asp Ser Asn Arg Arg Gly His Arg His

330 335 340

tcc aaa gag tat att gtg gat gat gaa gat gtg gag agc aga gat gaa 1108

Ser Lys Glu Tyr Ile Val Asp Asp Glu Asp Val Glu Ser Arg Asp Glu

345 350 355

tat gaa aga caa agg aga gag gag gaa tac cag gca cgc tac aga agt 1156

Tyr Glu Arg Gln Arg Arg Glu Glu Glu Tyr Gln Ala Arg Tyr Arg Ser

360 365 370 375

gat cca aat ctg gcc cgg tat ccc gta aag cca caa ccc tac gaa gaa 1204

Asp Pro Asn Leu Ala Arg Tyr Pro Val Lys Pro Gln Pro Tyr Glu Glu

380 385 390

caa atg cgc atc cac gct gag gtg tcc agg gca cga cat gag aga agg 1252

Gln Met Arg Ile His Ala Glu Val Ser Arg Ala Arg His Glu Arg Arg

395	400	405	
cac agt gat gtt tct ttg gca aac gct gaa cta gaa gat tcc agg att			1300
His Ser Asp Val Ser Leu Ala Asn Ala Glu Leu Glu Asp Ser Arg Ile			
410	415	420	
tct ctg cta agg atg gat aga cca tca agg caa aga tct gta tct gaa			1348
Ser Leu Leu Arg Met Asp Arg Pro Ser Arg Gln Arg Ser Val Ser Glu			
425	430	435	
cgt aga gct gca atg gaa aac caa cga tcg tat tca atg gaa aga act			1396
Arg Arg Ala Ala Met Glu Asn Gln Arg Ser Tyr Ser Met Glu Arg Thr			
440	445	450	455
cga gag gct cag gga caa agt tct tat cca caa agg acc tca aat cat			1444
Arg Glu Ala Gln Gly Gln Ser Ser Tyr Pro Gln Arg Thr Ser Asn His			
460	465	470	
agt cct ccc acc cct cgg cgg agc cct ata ccg ctt gat aga cca gac			1492
Ser Pro Pro Thr Pro Arg Arg Ser Pro Ile Pro Leu Asp Arg Pro Asp			
475	480	485	
atg agg cgc gct gac tcc cta cgg aaa cag cac cac tta gat ccc agc			1540
Met Arg Arg Ala Asp Ser Leu Arg Lys Gln His His Leu Asp Pro Ser			
490	495	500	
tct gct gtg agg aaa acg aag cga gaa aaa atg gaa acc acc atg tta agg			1588
Ser Ala Val Arg Lys Thr Lys Arg Glu Lys Met Glu Thr Met Leu Arg			
505	510	515	

aat gat tct ttg agt tca gac cag tcc gag tca gtg agg ccg ccc cca	1636		
Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asp Gln Ser Glu Ser Val Arg Pro Pro Pro			
520	525	530	535
cca agg cct cat aaa tcc aag aaa gga ggt aaa atg cgc cag gtt tca	1684		
Pro Arg Pro His Lys Ser Lys Lys Gly Gly Lys Met Arg Gln Val Ser			
540	545	550	
ctg agc agc tcg gag gag ctg gca tcc aca cct gag tat aca agc	1732		
Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Leu Ala Ser Thr Pro Glu Tyr Thr Ser			
555	560	565	
tgt gat gat gtg gag ctg gaa agc gag agt gtg agt gag aaa ggg gac	1780		
Cys Asp Asp Val Glu Leu Glu Ser Glu Ser Val Ser Glu Lys Gly Asp			
570	575	580	
agt caa aag gga aaa aga aaa act agt gag cag gga gtt ttg tcg gat	1828		
Ser Gln Lys Gly Lys Arg Lys Thr Ser Glu Gln Gly Val Leu Ser Asp			
585	590	595	
tct aac acc agg tct gag aga caa aag aaa agg atg tac tat ggt ggc	1876		
Ser Asn Thr Arg Ser Glu Arg Gln Lys Lys Arg Met Tyr Tyr Gly Gly			
600	605	610	615
cac tct ttg gaa gag gat ttg gaa tgg tct gag cct cag att aag gac	1924		
His Ser Leu Glu Glu Asp Leu Glu Trp Ser Glu Pro Gln Ile Lys Asp			
620	625	630	

tct	ggg	gta	gat	acc	tgt	agt	agc	aca	acc	ctt	aac	gag	gag	cat	agc	1972
Ser	Gly	Val	Asp	Thr	Cys	Ser	Ser	Thr	Thr	Leu	Asn	Glu	Glu	His	Ser	
635															645	
cat	agt	gat	aag	cac	cct	gtg	acc	tgg	cag	cca	tcc	aaa	gat	gga	gat	2020
His	Ser	Asp	Lys	His	Pro	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Ser	Lys	Asp	Gly	Asp	
650															660	
cgc	cta	att	ggt	cgt	att	tta	tta	aat	aag	cgt	tta	aaa	gat	ggg	agt	2068
Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Ile	Leu	Leu	Asn	Lys	Arg	Leu	Lys	Asp	Gly	Ser	
665															675	
gta	cct	cga	gac	tca	gga	gca	atg	ctg	ggc	tta	aag	gtt	gta	gga	gga	2116
Val	Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Gly	Leu	Lys	Val	Val	Gly	Gly	
680															695	
aag	atg	act	gaa	tca	ggt	cga	ctt	tgt	gca	ttt	att	acc	aaa	gta	aaa	2164
Lys	Met	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Cys	Ala	Phe	Ile	Thr	Lys	Val	Lys	
700															710	
aaa	gga	agt	tta	gct	gat	act	gta	gga	cat	ctt	aga	cca	ggt	gat	gaa	2212
Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Asp	Thr	Val	Gly	His	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Glu	
715															725	
gtc	ttg	gaa	tgg	aat	ggg	agg	cta	ttg	caa	gga	gcc	aca	ttt	gag	gaa	2260
Val	Leu	Glu	Trp	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Thr	Phe	Glu	Glu	
730															740	
gtt	tac	aac	att	att	cta	gaa	tcc	aaa	cct	gaa	cca	caa	gtt	gag	ctt	2308

Val Tyr Asn Ile Ile Leu Glu Ser Lys Pro Glu Pro Gln Val Glu Leu

745 750 755

gtt gtt tca agg cca att gga gat att cct aga ata cct gat agc acg 2356

Val Val Ser Arg Pro Ile Gly Asp Ile Pro Arg Ile Pro Asp Ser Thr

760 765 770 775

cat gca caa ctg gaa tcc agt tct agc tca ttt gaa tct caa aaa atg 2404

His Ala Gln Leu Glu Ser Ser Ser Ser Phe Glu Ser Gln Lys Met

780 785 790

gac cgt cct tct ata tcc gtt acc tca ccc atg agt cct ggc atg ctg 2452

Asp Arg Pro Ser Ile Ser Val Thr Ser Pro Met Ser Pro Gly Met Leu

795 800 805

agg gat gtc ccg cag ttc tta tct gga cag ctt tca ata aaa cta tgg 2500

Arg Asp Val Pro Gln Phe Leu Ser Gly Gln Leu Ser Ile Lys Leu Trp

810 815 820

ttt gac aag gtt ggt cac cag ttg ata gtt aca att ttg gga gca aag 2548

Phe Asp Lys Val Gly His Gln Leu Ile Val Thr Ile Leu Gly Ala Lys

825 830 835

gat ctc cct tcc agg gaa gat ggg agg cca agg aat cct tat gtt aag 2596

Asp Leu Pro Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Arg Asn Pro Tyr Val Lys

840 845 850 855

att tac ttc ctt cca gat aga agt gat aaa aat aag aga aga aca aaa 2644

Ile Tyr Phe Leu Pro Asp Arg Ser Asp Lys Asn Lys Arg Arg Thr Lys

860

865

870

aca gtc aag aaa act ttg gaa ccc aaa tgg aac cag act ttc att tat 2692

Thr Val Lys Lys Thr Leu Glu Pro Lys Trp Asn Gln Thr Phe Ile Tyr

875

880

885

tct cct gtc cac cga aga gaa ttc cgt gaa cga atg ctg gaa att acc 2740

Ser Pro Val His Arg Arg Glu Phe Arg Glu Arg Met Leu Glu Ile Thr

890

895

900

ctt tgg gat caa gct aga gtt cga gaa gaa gag agc gaa ttc tta gga 2788

Leu Trp Asp Gln Ala Arg Val Arg Glu Glu Glu Ser Glu Phe Leu Gly

905

910

915

gag att tta att gaa ttg gaa aca gct ttg cta gat gat gag ccg cac 2836

Glu Ile Leu Ile Glu Leu Glu Thr Ala Leu Leu Asp Asp Glu Pro His

920

925

930

935

tgg tat aag ctg cag acc cat gat gtc tcc tca ttg cca ctc cct cgc 2884

Trp Tyr Lys Leu Gln Thr His Asp Val Ser Ser Leu Pro Leu Pro Arg

940

945

950

cct tcc cca tat ctg ccc cgg agg cag ctc cat gga gag agc cca acg 2932

Pro Ser Pro Tyr Leu Pro Arg Arg Gln Leu His Gly Glu Ser Pro Thr

955

960

965

cgc agg ctg caa agg tcg aag aga ata agt gac agt gaa gtg tct gac 2980

Arg Arg Leu Gln Arg Ser Lys Arg Ile Ser Asp Ser Glu Val Ser Asp

970

975

980

tac gac tgc gag gat ggc gtg gga gta gtg tca gat tat cga cac aat 3028

Tyr Asp Cys Glu Asp Gly Val Gly Val Val Ser Asp Tyr Arg His Asn

985

990

995

ggc cgc gat ctt caa agc tcc acg ttg tcg gtg cca gaa caa gtc atg 3076

Gly Arg Asp Leu Gln Ser Ser Thr Leu Ser Val Pro Glu Gln Val Met

1000

1005

1010

1015

tca tca aat cat tgc tca cca tca ggg tct cct cat cga gta gat gtt 3124

Ser Ser Asn His Cys Ser Pro Ser Gly Ser Pro His Arg Val Asp Val

1020

1025

1030

ata gga agg aca agg tca tgg tcg cct agt gcc cct cct cct caa agg 3172

Ile Gly Arg Thr Arg Ser Trp Ser Pro Ser Ala Pro Pro Pro Gln Arg

1035

1040

1045

aat gtg gaa cag ggg cac cga ggg aca cgt gct act ggc cat tac aac 3220

Asn Val Glu Gln Gly His Arg Gly Thr Arg Ala Thr Gly His Tyr Asn

1050

1055

1060

aca att agc cga atg gat aga cac cgt gtc atg gat gac cac tac tct 3268

Thr Ile Ser Arg Met Asp Arg His Arg Val Met Asp Asp His Tyr Ser

1065

1070

1075

tca gat aga gac agg gat tgt gaa gca gca gat aga cag cca tat cac 3316

Ser Asp Arg Asp Arg Asp Cys Glu Ala Ala Asp Arg Gln Pro Tyr His

1080

1085

1090

1095

aga tcc aga tca aca gaa caa cgg cct ctc cta gag cgg acc acc acc	3364		
Arg Ser Arg Ser Thr Glu Gln Arg Pro Leu Leu Glu Arg Thr Thr Thr			
1100	1105	1110	
cgc tcc aga tcc tct gaa cgt cct gat aca aac ctc atg agg tcg atg	3412		
Arg Ser Arg Ser Ser Glu Arg Pro Asp Thr Asn Leu Met Arg Ser Met			
1115	1120	1125	
cct tca tta atg act gga aga tct gcc cct cct tca cct gcc tta tcg	3460		
Pro Ser Leu Met Thr Gly Arg Ser Ala Pro Pro Ser Pro Ala Leu Ser			
1130	1135	1140	
agg tct cac cct cgt acc ggg tct gtc cag aca agc cca tca agt act	3508		
Arg Ser His Pro Arg Thr Gly Ser Val Gln Thr Ser Pro Ser Ser Thr			
1145	1150	1155	
ccg gga aca gga cga agg ggc cga cag ctt cca cag ctt cca cca aag	3556		
Pro Gly Thr Gly Arg Arg Gly Arg Gln Leu Pro Gln Leu Pro Pro Lys			
1160	1165	1170	1175
gga aca ttg gag aga agt gct atg gat ata gag gag aga aat cgc caa	3604		
Gly Thr Leu Glu Arg Ser Ala Met Asp Ile Glu Glu Arg Asn Arg Gln			
1180	1185	1190	
atg aaa ctt aac aaa tac aaa cag gta gcc gga tca gac ccc aga ctg	3652		
Met Lys Leu Asn Lys Tyr Lys Gln Val Ala Gly Ser Asp Pro Arg Leu			
1195	1200	1205	
gag caa gat tac cat tcg aag tat cgc tca gga tgg gat cca cat aga	3700		

Glu Gln Asp Tyr His Ser Lys Tyr Arg Ser Gly Trp Asp Pro His Arg

1210

1215

1220

ggg gca gat act gtt tcc act aaa tcc tcg gac agt gat gta agt gat 3748

Gly Ala Asp Thr Val Ser Thr Lys Ser Ser Asp Ser Asp Val Ser Asp

1225

1230

1235

gta tct gcg gtt tca agg act agt agt gct tct cgt ttc agc agc aca 3796

Val Ser Ala Val Ser Arg Thr Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ser Ser Thr

1240 1245 1250 1255

agc tac atg tcc gtc caa tca gag cgg ccg aga gga aac agg aaa atc 3844

Ser Tyr Met Ser Val Gln Ser Glu Arg Pro Arg Gly Asn Arg Lys Ile

1260

1265

1270

agt gtc ttt aca tcc aaa atg caa aac aga cag atg ggc gtg tcg ggg 3892

Ser Val Phe Thr Ser Lys Met Gln Asn Arg Gln Met Gly Val Ser Gly

1275

1280

1285

aag aac ttg acc aaa agc acc agc atc agt gga gac atg tgc tca ctg 3940

Lys Asn Leu Thr Lys Ser Thr Ser Ile Ser Gly Asp Met Cys Ser Leu

1290

1295

1300

gag aag aat gac ggc agc cag tcc gac act gca gtg ggc gcc ctg ggt 3988

Glu Lys Asn Asp Gly Ser Gln Ser Asp Thr Ala Val Gly Ala Leu Gly

1305

1310

1315

acc agt ggc aag aag cgg cga tct agc att ggg gcc aaa atg gta gct 4036

Thr Ser Gly Lys Lys Arg Arg Ser Ser Ile Gly Ala Lys Met Val Ala

1320

1325

1330

1335

att gtt ggt ctc tca cgg aaa agt cgc agt gcc tct caa ctc agc caa 4084
 Ile Val Gly Leu Ser Arg Lys Ser Arg Ser Ala Ser Gln Leu Ser Gln

1340

1345

1350

acc gaa gga gga ggt aaa aag cta cgg agc act gtt cag aga agc acg 4132
 Thr Glu Gly Gly Lys Lys Leu Arg Ser Thr Val Gln Arg Ser Thr
 1355 1360 1365

gag acc ggg cta gca gtg gag atg agg aac tgg atg acc cgc cag gcc 4180
 Glu Thr Gly Leu Ala Val Glu Met Arg Asn Trp Met Thr Arg Gln Ala
 1370 1375 1380

agc cgg gaa tcc aca gat ggc agc atg aac agc tat agc tcg gaa gga 4228
 Ser Arg Glu Ser Thr Asp Gly Ser Met Asn Ser Tyr Ser Ser Glu Gly
 1385 1390 1395

aat ctg atc ttc cct ggg gtc cgc ctg gcc tct gac agc cag ttc agt 4276
 Asn Leu Ile Phe Pro Gly Val Arg Leu Ala Ser Asp Ser Gln Phe Ser
 1400 1405 1410 1415

gat ttc ctg gat ggc ctg ggc cct gct cag cta gtg gga cgc cag acc 4324
 Asp Phe Leu Asp Gly Leu Gly Pro Ala Gln Leu Val Gly Arg Gln Thr
 1420 1425 1430

ctg gct act cct gca atg ggt gac att cag gtg gga atg atg gat aaa 4372
 Leu Ala Thr Pro Ala Met Gly Asp Ile Gln Val Gly Met Met Asp Lys
 1435 1440 1445

aag gga cag ctg gag gta gaa atc atc cgg gcg cgc ggc ctt gtg gta 4420
 Lys Gly Gln Leu Glu Val Glu Ile Ile Arg Ala Arg Gly Leu Val Val

1450 1455 1460

aaa cca ggt tcc aag aca ctg cca gca ccg tat gtc aag gtg tat ctg 4468
 Lys Pro Gly Ser Lys Thr Leu Pro Ala Pro Tyr Val Lys Val Tyr Leu

1465 1470 1475

tta gac aac gga gtc tgc ata gcc aaa aag aaa acc aag gtg gcg aga 4516
 Leu Asp Asn Gly Val Cys Ile Ala Lys Lys Thr Lys Val Ala Arg
 1780 1485 1490 1495

aag acc ctg gag ccc ctg tac cag cag ctc ttg tcc ttc gag gag agc 4564
 Lys Thr Leu Glu Pro Leu Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Phe Glu Glu Ser
 1500 1505 1510

ccc cag ggg agg gtg tta cag atc att gtc tgg gga gat tat ggt cgt 4612
 Pro Gln Gly Arg Val Leu Gln Ile Ile Val Trp Gly Asp Tyr Gly Arg
 1515 1520 1525

atg gat cac aaa tcc ttt atg gga gtg gcc cag ata ctc tta gat gaa 4660
 Met Asp His Lys Ser Phe Met Gly Val Ala Gln Ile Leu Leu Asp Glu
 1530 1535 1540

ctg gaa cta tcc aac atg gtg att gga tgg ttc aaa ctc ttc cct cct 4708
 Leu Glu Leu Ser Asn Met Val Ile Gly Trp Phe Lys Leu Phe Pro Pro
 1545 1550 1555

tcc tcc cta gta gat cca acc tcg gca cct ctg aca aga aga gct tcc 4756
 Ser Ser Leu Val Asp Pro Thr Ser Ala Pro Leu Thr Arg Arg Ala Ser
 1560 1565 1570 1575

caa tcg tct ctg gaa agt tct acc gga cct tct tac tct cgt tca 4801
 Gln Ser Ser Leu Glu Ser Ser Thr Gly Pro Ser Tyr Ser Arg Ser
 1580 1585 1590

tagcaactat aaaactgttg tcacaacaac cagcgataca aaaaccagaa gaaaacgcac 4861

agggtggaagc ccctggtaac actgcgtgct tggatgttg tctacagagc ccacgtctag 4921

ggataccaag cagtcctgtg ttctcagagg aagtcgtaca cattgtgccc tagcaaagg 4980

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> **Mus musculus**

<400> 3

ttgcgcgtcactcttctggccctcccttgccattctgctctgaaagc 45

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> **Mus musculus**

<400> 4

acctacgtgactacgt 16

【図面の簡単な説明】

【図1】 cAMP 結合ドメインの配列比較図。

【図2】 cAMP-A への cAMP の結合を示すグラフ。

【図3】 Rim1 及び Rim2 の間での、ジンクフィンガー、PDZ、及び C2 ドメインのアミノ酸同一性比較。

【図4】 cAMP-GEFII と Rim1 又は Rim2 との相互作用を示すイムノブロッティング。

【図5】 ラットの各組織中並びに内分泌細胞及び神経内分泌細胞由来細胞経における cAMP-GEFII、Rim1、及び Rim2 のノーザンプロット分析。

【図6】 マウス脳及び下垂体における Rim1 及び Rim2 の所在を示す *in situ* ハイブリダイゼーション。

【図7】 酵母ツーハイブリッドアッセイの結果を示すグラフ。

【図8】 *in vitro* での Rab3A 及び Rim1 又は Rim2 の相互作用を示すイムノブロッティング。

【図9】 GH 及び cAMP-GEFII で共トランスフェクトした PC12 細胞からの高 K⁺ 誘導 GH 分泌の時間的推移を示すグラフ。

【図10】 トランスフェクト PC12 細胞からの GH 分泌に対する フォルスコリンの影響を示すグラフ。

【図11】 種々の変異 cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からの フォルスコリン誘導 GH 分泌を示すグラフ。

【図12】 cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からの フォルスコリン誘導 GH 分泌に対する H-89 の影響を示すグラフ。

【図13】 cAMP 依存性エキソサイトシスのモデルを示す概念図。

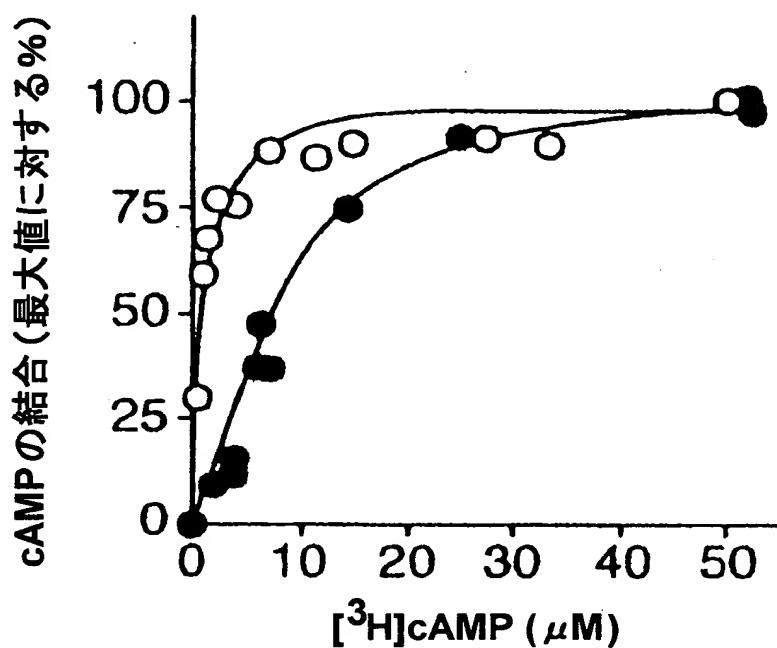
【書類名】

図面

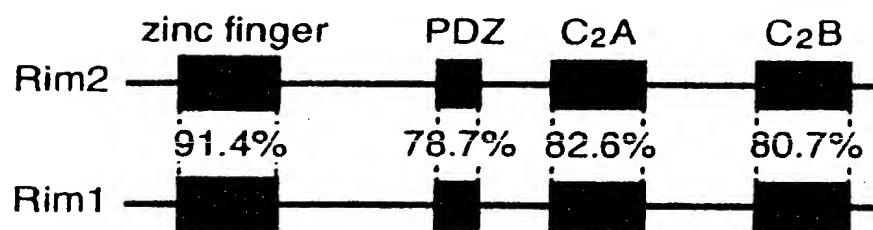
【図1】

cAMP-A C D I G T N W Y A V L A S I L D V K V S E T S S H Q D A V T I C T L G I C T A F [REDACTED] S I L - D N T P H [REDACTED] T I V T R 130
cAMP-B C E E G T S W Y I I L K S V N V - V I Y G K G - - - V - V C T L H E G D D P K L A L V N D A P A A S I V L R 439
Ri α -A C D E G D N P Y V I D O E M D V Y V N N E W A T - - - - S V G E G G S P [REDACTED] L A L I Y G T P A A T V K A K 218
Ri α -B C N E P G D E P F I I L E T R A V - L Q R R S E N E E F E V G R L G P S D Y F [REDACTED] I A L L M N R P A A T V U V A R 342

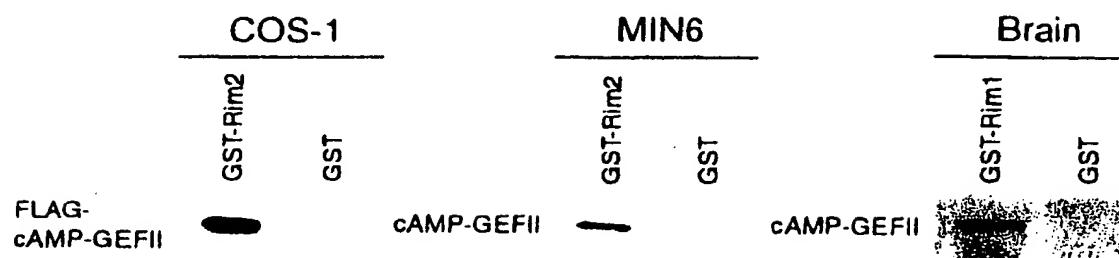
【図2】



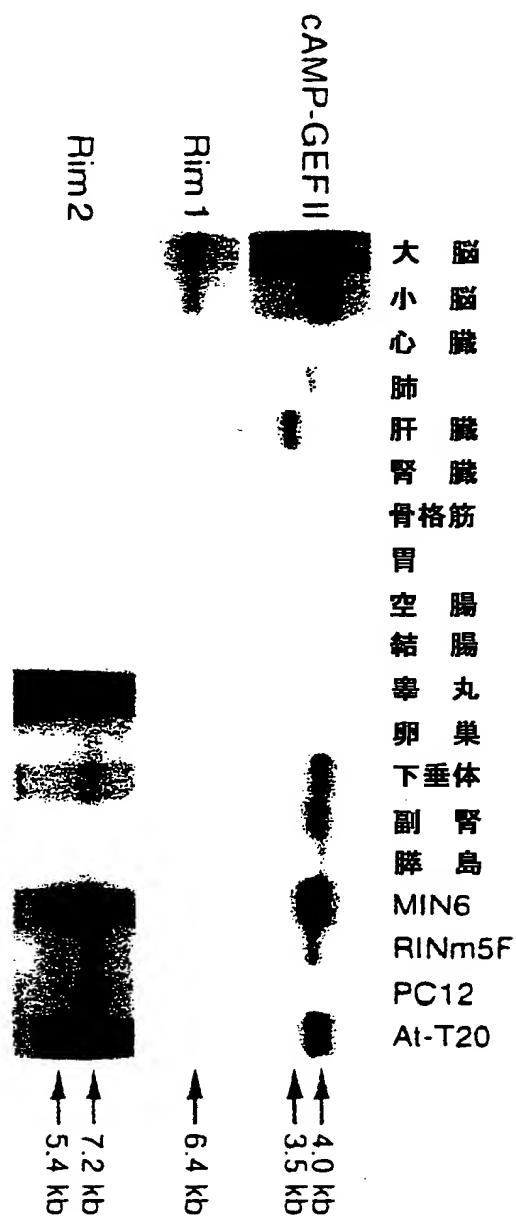
【図3】



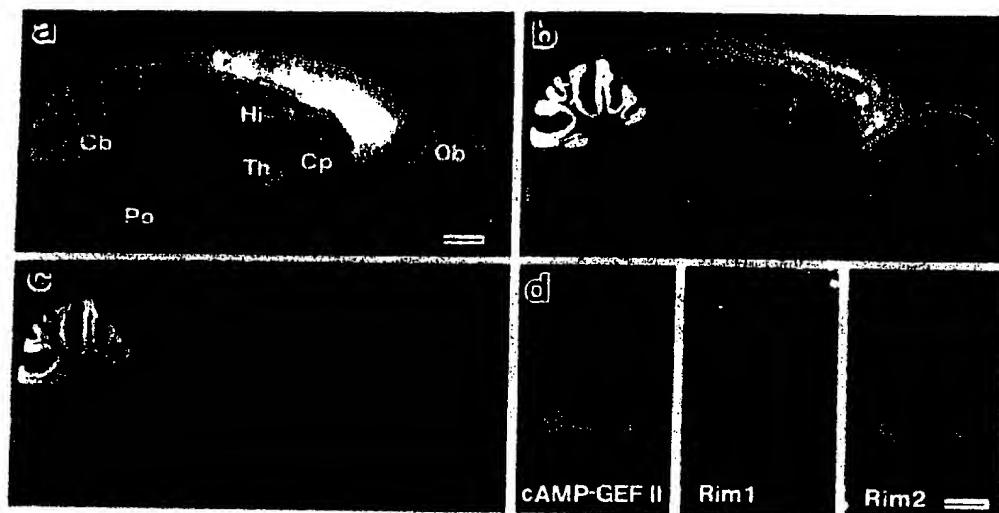
【図4】



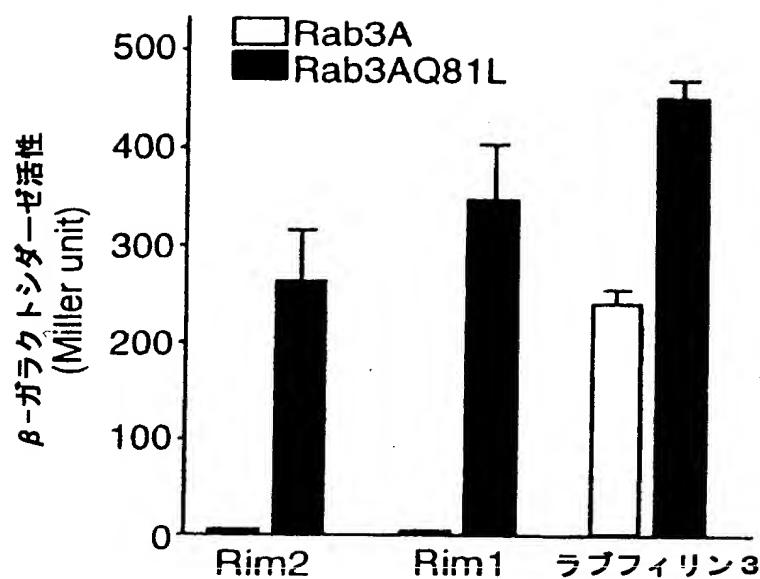
【図5】



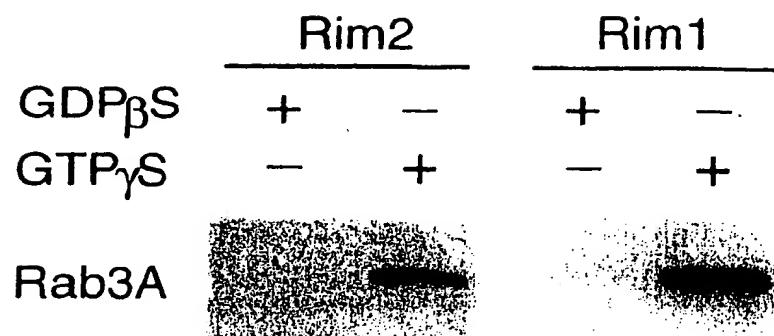
【図6】



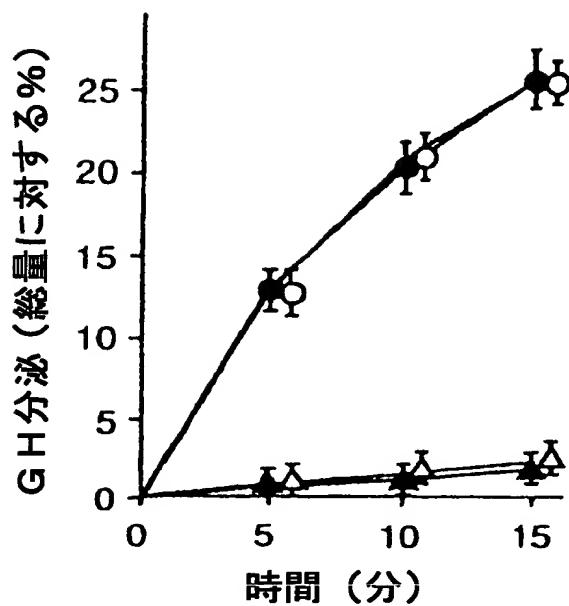
【図7】



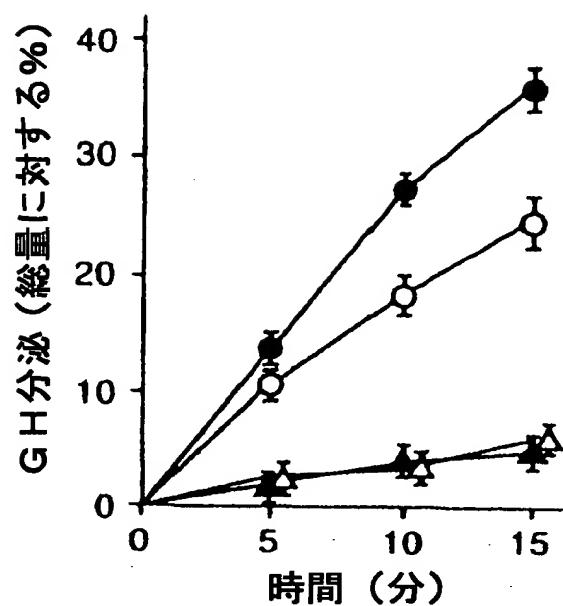
【図8】



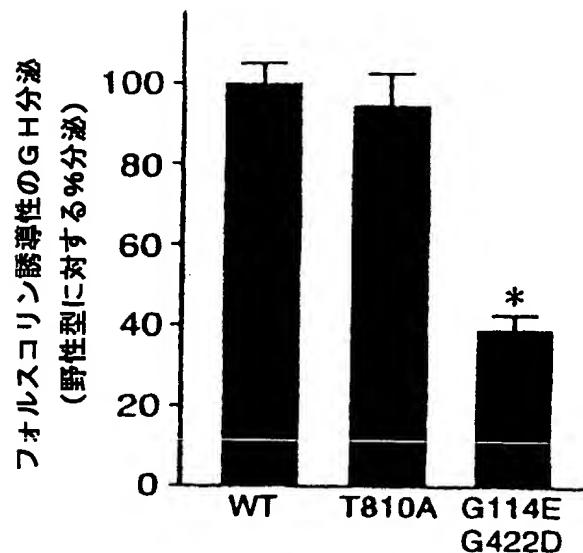
【図9】



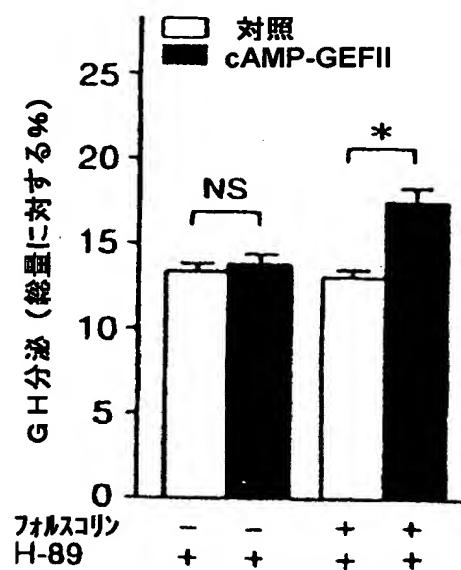
【図10】



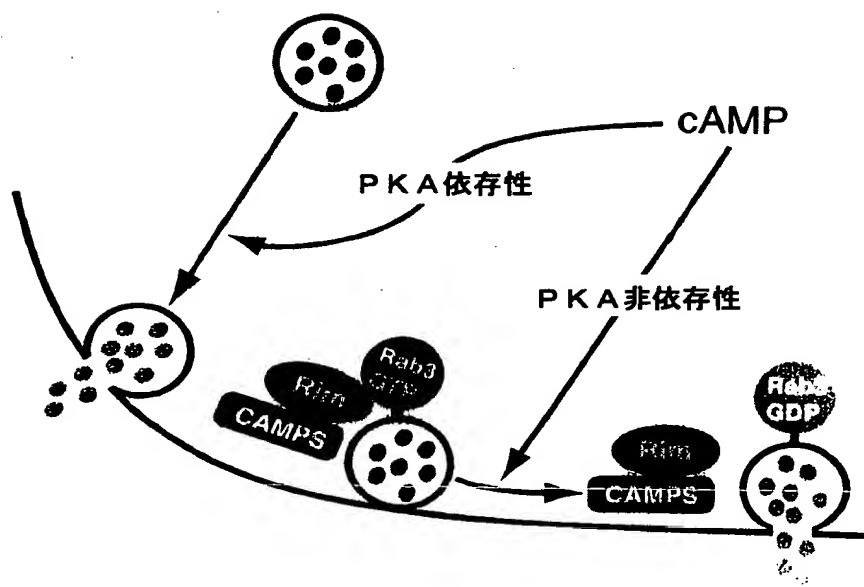
【図11】



【図12】



【図13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞内小胞輸送系の機能の解明に役立ち該輸送系が関与する神経細胞や分泌系細胞に関係した疾患の治療薬の開発に利用できるタンパク質を提供する。

【解決手段】 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって、GDP/GTP交換反応制御因子IIと相互作用する性質を有するタンパク質。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第288372号
受付番号	59900990615
書類名	特許願
担当官	喜多川 哲次 1804
作成日	平成11年11月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年10月 8日
【特許出願人】	
【識別番号】	595145094
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区千葉寺町638-1 青葉の森の街22-1-4
【氏名又は名称】	清野 進
【代理人】	申請人
【識別番号】	100104639
【住所又は居所】	大阪市中央区北浜2丁目5番13号 北浜平和ビル2階 早坂国際特許事務所
【氏名又は名称】	早坂 巧

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [595145094]

1. 変更年月日 1998年12月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 千葉県千葉市中央区千葉寺町638-1 青葉の森の街22-
1-4

氏 名 清野 進

出願人履歴情報

識別番号 [000228545]

1. 変更年月日 1994年11月30日

[変更理由] 住所変更

住 所 兵庫県芦屋市春日町3番19号

氏 名 日本ケミカルリサーチ株式会社